

左卡尼汀注射液对阿霉素所致心肌细胞损伤的保护作用

李雅静, 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

摘 要: **目的** 观察左卡尼汀注射液对阿霉素所致的心肌细胞损伤的保护作用。**方法** 将培养 5 d 的新生 Wistar 乳鼠心肌细胞随机分为正常对照组、阿霉素 1 $\mu\text{g/mL}$ 阳性对照组和左卡尼汀 10、20、30 $\mu\text{g/mL}$ 保护组, 加药后继续培养 24 h, 测定细胞存活率、乳酸脱氢酶 (LDH) 释放量、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量。**结果** 左卡尼汀能显著提高受损心肌细胞的存活率, 抑制 LDH 释放量, 减少 MDA 的生成, 提高 SOD 活性。**结论** 左卡尼汀对阿霉素所致的心肌细胞损伤具有保护作用。

关键词: 左卡尼汀注射液; 阿霉素; 心肌细胞

中图分类号: R969 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2013)01-0018-03

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2013.01.005

Protection of Levocarnitine Injection on myocardial cell injury induced by adriamycin

LI Ya-jing, WANG Chen

Tianjin Key Laboratory of Tumor Prevention and Therapeutics, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China

Abstract: Objective To observe the protective effects of Levocarnitine Injection on myocardial cell injury induced by adriamycin. **Methods** From newborn Wistar neonatal rats, the cardiomyocytes cultured for 5 d were randomly divided into normal control group, adriamycin (1 $\mu\text{g/mL}$) positive control group, and levocarnitine (10, 20, and 30 $\mu\text{g/mL}$) protection group, then followed by being continuously cultured for 24 h after the administration. Cell survival rate, lactate dehydrogenase (LDH) release, superoxide dismutase (SOD) activity, and malondialdehyde (MDA) contents were detected. **Results** Levocarnitine could significantly improve the survival rate of the damaged myocardial cells, inhibit the release of LDH, decrease the level of MDA, and promote the activity of SOD. **Conclusion** Levocarnitine has protective effects on the myocardial cell injury induced by adriamycin.

Key words: Levocarnitine Injection; adriamycin; myocardial cells

阿霉素属于蒽环类抗癌药, 临床上广泛用于白血病、淋巴瘤等肿瘤的治疗, 但由于其具有心肌毒性, 使其临床应用受到限制。查阅相关文献, 临床上有时采用静脉滴注左卡尼汀对其进行预防^[1-2]。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, 适用于慢性肾衰长期血透病人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。本实验采用体外培养新生乳鼠心肌细胞复制阿霉素损伤模型, 观察不同剂量左卡尼汀对中毒心肌细胞的保护作用。

1 材料

注射用盐酸阿霉素 (浙江海正药业有限公司,

规格 10 mg/支, 批号 070702), 左卡尼汀注射液 (常州兰陵制药有限公司, 规格 5 mL : 1 g, 批号 080703)。胰酶、DMEM (High Glucose) 细胞培养基、胎牛血清 (Gibco 公司), II 型胶原酶、MTT (Sigma 公司), 磷酸盐缓冲液 (PBS)。

成年健康未生育 SD 大鼠, 雌鼠体质量 250~280 g, 共 2 只, 雄鼠体质量 280~320 g, 共 3 只, 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的, 日龄 1~3 d, 每次实验用 10 只。

CLASS II TypeA/B3 超净工作台 (郑州南北仪器设备有限公司), 德国 Eppendorf J810R 离心机,

收稿日期: 2012-11-16

作者简介: 李雅静, 女, 主管药师, 硕士研究生, 研究方向: 医院药学。Tel: (022)23340123-5105 E-mail: liyajing919@163.com

*通信作者 王 晨, 女, 主任药师, 研究方向: 医院药学。Tel: (022)23340123-5105 E-mail: jieyi789@126.com

Olympus IX70 倒置显微镜, HEPA class100 恒温细胞培养箱 (美国 Thermo 公司), Synergy HT 型酶联免疫检测仪 (美国 Bio-Tek 公司)。

2 方法

2.1 药物的配制

根据说明书中左卡尼汀的给药剂量范围, 选取低、中、高 3 个剂量, 按成人体质量 60 kg, 体表面积约为 1.5 m^2 计算剂量, 按 1×10^6 个心肌细胞约为 1 g 计算出最终细胞的低、中、高 3 个给药浓度, 将药物溶于含 10%FBS 的 DMEM 细胞培养基中。

2.2 乳鼠心肌细胞的培养方法^[3-4]

2.2.1 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, 取出心脏, 置 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。将其剪成约 1 mm^3 的组织碎块, 加入 0.08%胰酶消化 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°C 孵箱消化 8 min, 吸出上清液, 加入含血清的 DMEM 细胞培养基中终止消化, 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。用 200 目筛网滤过收集细胞悬液, 1 000 r/min 离心 8 min, 收集细胞。

2.2.2 心肌细胞的纯化 将培养液 (DMEM+20%胎牛血清) 加入离心管中, 移入培养瓶中, 37°C 培养 1 h, 除去贴壁的成纤维细胞, 将细胞浓度调整至 $5 \times 10^4/\text{mL}$, 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 4~5 d, 待心肌细胞形态及细胞搏动稳定后, 进行研究。

2.3 实验分组

将培养后稳定的心肌细胞随机分为 8 组, 分别

为空白对照组, 阿霉素 ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) 阳性对照组, 左卡尼汀 10、20、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组, 阿霉素+左卡尼汀 10、20、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组, 各组 6 个平行孔。

2.4 观察指标

上述各组于给药 24 h 后, 采用 MTT 法测定细胞存活率, 在 96 孔细胞培养板中每孔加入 4 mg/mL MTT 溶液 50 μL , 37°C 孵育 4 h 后, 每孔加入 DMSO 溶液 100 μL , 振荡 10 min 后, 酶联免疫检测仪测定各孔 490 nm 处吸光度 (A) 值。采用试剂盒进行乳酸脱氢酶 (LHD) 释放、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及丙二醛 (MDA) 含量的测定。

2.5 统计分析

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据分析应用 SPSS 11.5 软件包, 各组间比较采用完全随机设计的单因素方差分析 (One-way ANOVA), 方差齐时采用 Dunnett 方法, 方差不齐时采用 Games-Howell 方法。

3 结果

3.1 对正常心肌细胞存活率的影响

与空白对照组相比, 随着左卡尼汀质量浓度的增加, 存活心肌细胞数量增加, 细胞存活率上升。结果见表 1。

表 1 MTT 测定细胞存活率结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Results of cell survival rate by MTT ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组 别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A 值
空白对照	—	0.388 ± 0.042
左卡尼汀注射液	10	0.407 ± 0.022
	20	0.421 ± 0.023
	30	0.454 ± 0.048

3.2 对阿霉素损伤的心肌细胞存活率的影响

左卡尼汀可升高阿霉素损伤的心肌细胞的 A 值, 随着左卡尼汀质量浓度的增加, 细胞存活率上升, 与阿霉素组相比有明显差别。结果见表 2 和图 1。

表 2 LDH、MDA、SOD 的测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Determination of LDH, MDA, and SOD ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组 别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A 值	LDH/(U·L ⁻¹)	MDA/(nmol·L ⁻¹)	SOD/(U·L ⁻¹)
空白对照	—	0.388 ± 0.042	30.4 ± 1.5	3.81 ± 1.23	54.37 ± 5.69
阿霉素	1	$0.238 \pm 0.029^*$	$100.7 \pm 2.9^*$	$12.62 \pm 0.98^*$	$27.69 \pm 4.88^*$
阿霉素+左卡尼汀	1+10	$0.316 \pm 0.033^\Delta$	$66.3 \pm 2.5^\Delta$	$8.71 \pm 3.96^\Delta$	$33.61 \pm 4.26^\Delta$
	1+20	$0.324 \pm 0.036^\Delta$	$53.2 \pm 3.8^\Delta$	$6.64 \pm 2.98^\Delta$	$40.70 \pm 3.69^\Delta$
	1+30	$0.334 \pm 0.020^\Delta$	$45.7 \pm 5.2^\Delta$	$4.39 \pm 3.12^\Delta$	$50.63 \pm 4.23^\Delta$

与空白对照组比较: $^*P < 0.05$; 与阿霉素组比较: $^\Delta P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs blank group; $^\Delta P < 0.05$ vs adriamycin group

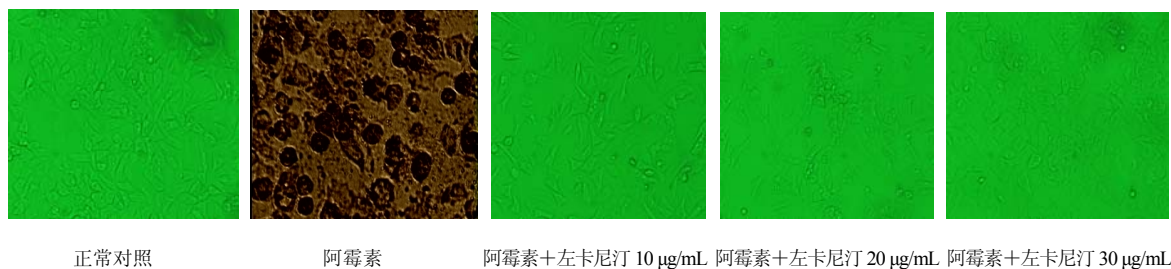


图 1 各组心肌细胞结构图

Fig. 1 Myocardial cell structure of rats in every group

3.3 对阿霉素损伤心肌细胞 LDH 活性的影响

左卡尼汀能有效减少阿霉素损伤心肌细胞的 LDH 释放, 各剂量组 LDH 活力较阿霉素组明显降低, 表现为良好的剂量相关性。结果见表 2。

3.4 对阿霉素损伤心肌细胞 MDA 含量及 SOD 活性的影响

与空白对照组相比, 阿霉素组心肌细胞的 MDA 含量显著升高, SOD 活性显著下降, 各剂量组均能使 MDA 含量下降及 SOD 活性提高, 结果见表 2。

4 讨论

抗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, 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: 可导致心肌无力, 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^[5-7]: 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 NADPH 脱氢酶作用下产生氧自由基, 同时氧自由基在 Fe^{3+} 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。

为了减少毒副作用, 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十分缺乏深入系统的研究。本实验也表明阿霉素对心肌细胞产生损伤作用后, 细胞形态发生改变, 细胞活力显著降低, 大量存在于心肌细胞中的 LDH 漏出增多, 并伴有 MDA 生成增多, SOD 活性下降, 表明阿霉素引起明显心肌细胞脂质过氧化反应, 导致心肌细胞损伤。

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, 降低了 MDA 含量, 升高了 SOD 活性, 且存在剂量相关性, 这表明左卡尼汀具有抗氧化损伤的能力, 可减轻阿霉素所致的心肌细胞生物膜系统的脂质过氧化反应, 提高自由基清除酶的活性, 能减轻细胞损伤, 保护心肌细胞的完整性。可见左卡尼汀可减轻阿霉素所致的心肌细胞损伤, 其保护作用与其抗自由基、减轻脂质过氧化反应有关。

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合理用药的依据, 减少毒副作用, 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物所致心脏毒性的临床观察——附 30 例报告 [J]. 新医学, 2007, 38(4): 229-231.
- [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): 268-269.
- [3] 王 宁, 李应东. 乳鼠心肌细胞原代培养方法的改进 [J]. 中国心血管病研究杂志, 2007, 5(12): 920-921.
- [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]. 华西药理学杂志, 2007, 22(1): 4-6.
- [5] Edward T H Y, Ann T T, Daniel J L, et al. Cardiovascular complication of cancer therapy [J]. *Circulation*, 2004, 109: 3122-3131.
- [6] Abeloff M D. *Clinical Oncology* [M]. Elsevier: Elsevier Science Health Science Division, 2000: 1047-1057.
- [7] Zucchi R, Danesi R. Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines [J]. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2003, 3(2): 151-171.