

【 安全性评价 】

辅酶 Q10 中枢神经系统的安全性评价

杨宏博^{1,2,3}, 孙庆弟^{1,2,3}, 谭莹^{1,2,3}, 刘慧浪^{1,2,3}, 廖伟^{1,2,3}, 史新辉^{1,2,3}, 苏敏^{1,2,3}, 包广雷^{1,2,3}, 王京昆^{1,2,3*}

1. 云南省药物研究所, 云南 昆明 650111
2. 云南白药集团创新研发中心, 云南 昆明 650111
3. 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 云南 昆明 650111

摘要: 目的 考察大剂量 ig 辅酶 Q10 对小鼠中枢神经系统的影响, 为临床安全性评价提供实验依据。方法 将小鼠随机分为溶媒对照组、紫苏油对照组、阳性对照组(氯丙嗪或地西洋)和辅酶 Q10 低、中、高剂量组(1.5、3.0 和 6.0 g/kg, 相当于临床等效剂量的 75、150 和 300 倍), 每组 12 只, 雌雄各半, 40 mL/kg 单次 ig 给药。直接观察小鼠一般行为活动; 转棒法观察小鼠运动协调能力; Anymaze 动物行为学视频分析系统观察小鼠自发活动和与阈下剂量戊巴比妥钠的协同作用。结果 与溶媒对照组、紫苏油对照组比较, 辅酶 Q10 3 个剂量组对小鼠一般行为活动、自发活动、运动协调能力和与阈下剂量戊巴比妥钠的协同作用均无显著差异。结论 大剂量 ig 辅酶 Q10 对小鼠中枢神经系统未见明显毒性作用。

关键词: 辅酶 Q10; 中枢神经系统; 毒性; 小鼠; 安全性评价; 运动协调能力; 自发活动; 协同作用

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)07-0926-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.07.008

Safety evaluation of coenzyme Q10 on central nervous system

YANG Hong-bo^{1,2,3}, SUN Qing-di^{1,2,3}, TAN Ying^{1,2,3}, LIU Hui-lang^{1,2,3}, LIAO Wei^{1,2,3}, SHI Xin-hui^{1,2,3}, SU Min^{1,2,3}, BAO Guang-lei^{1,2,3}, WANG Jing-kun^{1,2,3}

1. Yunnan Bai Yao Group Innovation and R&D Center, Kunming 650111, China
2. Drug Safety Evaluation Center of Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China
3. Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China

Abstract: Objective To investigate the effect of high-dose coenzyme Q10 on the central nervous system in mice, and to provide experimental basis for clinical safety evaluation. **Methods** Mice were randomly divided into vehicle control group, perillartine control group, positive control group (chlorpromazine or diazepam) and coenzyme Q10 low, medium and high dose groups (1.5, 3.0 and 6.0 g/kg, equivalent to 75, 150, and 300 times of clinical dosage, respectively). The corresponding drugs were ig given to mice with the volume of 40 mL/kg. The general behavior of mice was observed directly, the motor coordination ability was observed by rotating stick method, and Anymaze animal behavior video analysis system was used to observe the spontaneous activity of mice and synergistic reaction with sub-threshold dose of pentobarbital sodium. **Results** There were no significant differences in the general behavioral activity, and the number of spontaneous activity times, mean resident time, and ratio of sleeping were found in all coenzyme Q10 groups, compared with the vehicle and perillartine control groups. **Conclusion** High dose of coenzyme Q10 has no significantly toxic effect on the central nervous system in mice, which could provide a reliable experimental basis for further medication study and clinical application of high-dose coenzyme Q10.

Key words: coenzyme Q10; central nervous system; toxicity; mice; safety evaluation; motor coordination ability; spontaneous activity; synergistic reaction

收稿日期: 2017-02-15

作者简介: 杨宏博(1981-), 男, 内蒙古赤峰人, 工程师, 硕士, 主要从事新药研发和药物安全性评价。

Tel: (0871)684119937-8008 Fax: (0871)68417776 E-mail: yanghongboo@126.com。

*通信作者 王京昆, 男, 正高级工程师。 E-mail: wjkyimm@163.com

辅酶 Q10 (Coenzyme Q10) 是生命体内的一种辅酶 Q 类物质, 在细胞线粒体内呼吸链质子转移及电子传递中起重要作用, 直接参与一些特异酶的生化过程。辅酶 Q10 具有广泛的药用及保健功能, 在医药领域, 主要以辅助药物出现。在心血管疾病的临床应用上有效好的疗效, 其主要是改善心肌能量产生、具有抗氧化活性和使生物膜稳定的特性。在坏血病、糖尿病、病毒性肝炎等治疗中也有疗效。近年来还发现辅酶 Q10 对艾滋病也有辅助疗效, 已开展 II 期临床试验^[1]。在食品保健方面, 美国 FDA 在 2003 年批准将辅酶 Q10 作为食品添加剂应用到饮料、糖果、糕点、乳酪、酸奶等食品生产中^[2]。在化妆品行业, 辅酶 Q10 可清除氧自由基, 具有延缓衰老的功效, 受到许多化妆品厂家的重视^[3]。从而可以看出, 辅酶 Q10 在医药、食品保健及化妆品方面具有广阔的应用前景。

本试验通过研究大剂量给予辅酶 Q10 对小鼠中枢神经系统的影响, 评价其是否具有潜在的中枢神经毒性, 为辅酶 Q10 的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Anymaze 动物行为学视频分析系统 (型号 ST-60000, 美国 Stonling 公司); 大小鼠疲劳仪 (型号 DXP-2, 中国医学科学院); 纯水超纯水系统 (型号 ELIXTM-Mili-Qsynthesis, 法国倍捷公司); 电子天平 (型号 AB104-S, 北京塞多利斯天平有限公司); 电子天平 (型号 JJ-2000 型, 江苏常熟市双杰测试仪器厂生产)。

1.2 试药

辅酶 Q10 软胶囊 (玉溪健坤生物药业有限公司, 批号 20101203, 0.25 g/粒); 紫苏油 (湖南亚美生物科技有限公司, 批号 YH/091007); 灭菌纯化水 (自制, 批号 20101105); 盐酸氯丙嗪片 (上海信谊九福药业有限公司, 批号 100401, 25 mg/片); 地西洋片 (江苏济川制药有限公司, 批号 090720, 2.5 mg/片); 羧甲基纤维素钠 (天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号 20100228, CMC-Na); 氯化钠注射液 (昆明南疆制药有限公司, 批号 B100122G2); 戊巴比妥钠 (进口分装, 批号 20090120)。

1.3 实验动物

SPF 级昆明种小鼠, 雌雄各半, 体质量 18~22 g, 购自昆明医学院实验动物中心, 许可证号 SCXK (滇) 2010-0008。

SPF 级实验室条件: 雌雄分笼, 每笼 5 只, 自由摄食饮水。温度为 20~26 °C; 湿度 40%~70%; 换气次数: 10~20 次/h; 气流速度 0.1~0.2 m/s; 噪音 ≤ 60 dB; 工作照度 150~300 lx, 动物照度: 15~20 lx; 12 h/12 h 明暗交替。

2 方法

2.1 剂量设置及依据

辅酶 Q10 软胶囊临床为口服, 每天 1~3 次, 每次 2~8 粒, 为 0.25 g/粒, 以成人每天最大用量折算, 用量约为 6.0 g, 软胶囊内容物含辅酶 Q10 约 20%, 相当于 1.2 g。按成人 60 kg 计算折合临床人用剂量为 20 mg/kg 辅酶 Q10。1 mL 辅酶 Q10 软胶囊内容物相当于 0.93 g, 换算辅酶 Q10 浓度为 0.186 g/mL^[4]。

辅酶 Q10 小鼠药效学研究有效剂量为 0.30 g/kg, 给药周期 10 d^[5]。参照《药物安全药理研究技术指导原则》^[6], 选择 1.5、3.0、6.0 g/kg (相当于软胶囊内容物 7.5、15.0、30.0 g/kg) 作为小鼠中枢毒性实验的低、中、高剂量, 该剂量相当于小鼠药效学有效剂量的 5、10、20 倍, 相当于临床等效剂量的 75、150、300 倍。

2.2 药物的制备

2.2.1 受试药物的制备 取足量辅酶 Q10 软胶囊置于 50 °C 温浴 30 min, 使其融解, 自然冷却至室温。分别量取辅酶 Q10 软胶囊内容物 2.0、4.0 和 8.0 mL, 加紫苏油定溶至 10.0 mL, 充分混合均匀, 即得含辅酶 Q10 为 37.5、75.0 和 150.0 mg/mL 3 个剂量的混悬受试药物, 使用前混合均匀。

2.2.2 对照药物的制备 ① 0.5% CMC-Na 溶液的制备: 称取 0.75 g CMC-Na, 置于量筒中, 加适量纯化水搅拌均匀, 定溶至 150.0 mL, 充分混匀后, 室温保存备用。② 0.33 mg/mL 盐酸氯丙嗪混悬液的制备: 取盐酸氯丙嗪 1 片 (25 mg/片), 研磨成粉末, 加入适量 0.5% CMC-Na 溶液, 将混悬溶液移入量筒中, 加入 0.5% CMC-Na 溶液定容至 75.0 mL, 即得 0.33 mg/mL 的盐酸氯丙嗪混悬液。③ 83 μg/mL⁻¹ 地西洋混悬液的制备: 取地西洋 1 片 (2.5 mg/片), 研磨成粉末, 加入适量 0.5% CMC-Na 溶液, 将混悬溶液移入量筒中, 加入 0.5% CMC-Na 溶液定容至 30.0 mL, 即得 83 μg/mL 的地西洋混悬液。

2.3 一般行为观察 (直接观察法)^[7]

选择健康状况良好的小鼠 60 只, 雌雄各半, 随机分为 5 组, 即溶媒对照组、紫苏油对照组和辅酶

Q10 1.5、3.0 和 6.0 g/kg 剂量组，每组 12 只。各组均以 40 mL/kg 单次 ig 给药，观察小鼠的一般行为表现、姿势、步态、有无流涎、肌颤、分泌物、紫绀等，观察至给药后 5 h。

2.4 自发活动的影响^[7]

选择健康状况良好的小鼠 72 只，雌雄各半，随机分为 6 组，即溶媒对照组、紫苏油对照组、盐酸氯丙嗪 (13.3 mg/kg) 组和辅酶 Q10 1.5、3.0 和 6.0 g/kg 剂量组，每组 12 只。实验前，首先分别将小鼠放入 Anymaze 动物行为学视频分析系统的测定箱内约 3 min，使其适应环境。各组再以 40 mL/kg 单次平行 ig 给药，1.0 h 后将各组小鼠平行放入测定箱内，观察并记录小鼠在 5 min 内活动的跨区次数。

2.5 运动协调能力的影响 (转棒法)^[7]

2.5.1 动物训练及选择 将 DXP-2 大小鼠疲劳仪的转速设定为 30 r/min，选择健康状况良好的小鼠，分别多次放于大小鼠疲劳仪上进行爬行训练。经一段时间训练后，筛选在转棒上爬行时间不少于 15 s 小鼠，进行运动协调能力试验。

2.5.2 分组及指标观测 将筛选后的小鼠 60 只，雌雄各半，随机分为 5 组，即溶媒对照组、紫苏油对照组和辅酶 Q10 1.5、3.0、6.0 g/kg 剂量组，每组 12 只。各组以 40 mL/kg 单次平行 ig 给药，记录小鼠给药 1.0 h 后，在转速为 30 r/min 匀速转棒上停留时间，连续测定 3 次，取平均值(停留时间超过 3 min

的小鼠，记为 3 min)。

2.6 与阈下剂量戊巴比妥钠协同作用^[7]

选择健康状况良好的小鼠 72 只，雌雄各半，随机分为 6 组，即溶媒对照组、紫苏油对照组、地西泮 (3.33 mg/kg) 组和辅酶 Q10 1.5、3.0、6.0 g/kg 剂量组，每组 12 只。实验前，首先分别将小鼠放入 Anymaze 动物行为学视频分析系统的测定箱内约 3 min，使其适应环境。各组以 40 mL/kg 单次 ig 给药，1.0 h 后，每组小鼠再按 20 mL/kg 剂量 ip 阈下剂量的戊巴比妥钠 (28 mg/kg)，立即观察动物的翻正反射反应。观察各组动物 10 min 内翻正反射消失达 1 min 以上的动物数。

2.7 统计方法

结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，试验数据按照实际测出数据保留小数。结果采用 SPSS 17.0 统计软件包进行方差分析，方差齐用 LSD 分析，方差不齐则采用秩和检验，计数资料采用卡方检验。

3 结果与分析

3.1 一般行为观察 (直接观察法)

由表 1 可以看出，一般行为观察实验中，除溶媒对照组外，紫苏油对照组和辅酶 Q10 软胶囊内容物低、中、高 3 个剂量组小鼠在给药 1.0 h 后，有排软便现象，且 4 组之间排软便症状及程度相当，提示该现象与紫苏油的润肠作用相关，非为辅酶 Q10 对肠道的刺激作用。在其它小鼠一般行为的观察中，各组均未发现有异常行为现象。

表 1 一般行为活动观察结果 ($n = 12$)

Table 1 Observation results of general behavioral activity ($n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	软便	姿势	步态	流涎	肌颤	俯卧	紫绀	分泌物	活动减少
溶媒对照	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
紫苏油对照	—	+ (12)	—	—	—	—	—	—	—	—
辅酶 Q ₁₀	1.5	+ (9)	—	—	—	—	—	—	—	—
	3.0	+ (9)	—	—	—	—	—	—	—	—
	6.0	+ (12)	—	—	—	—	—	—	—	—

“—”: 正常; “+ (n)”: 异常和异常动物数

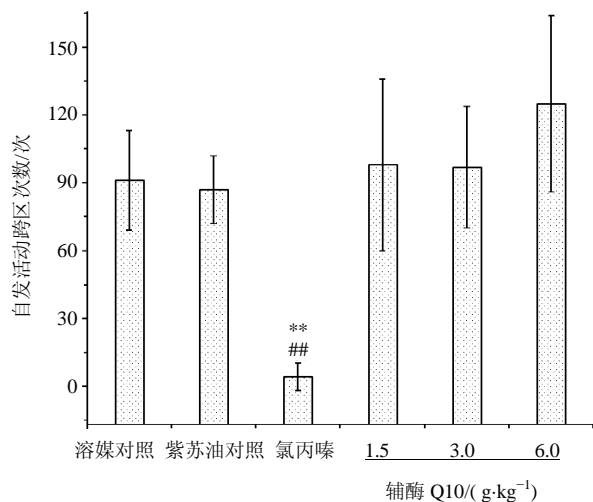
“—”: normal; “+ (n)”: abnormal and number of abnormal animals

3.2 自发活动的影响

与溶媒对照组、紫苏油对照组比较，盐酸氯丙嗪组小鼠自发活动次数明显降低，且差异显著 ($P < 0.01$)；辅酶 Q10 高剂量组有所增加；紫苏油对照组和辅酶 Q10 低、中剂量组无明显变化。见图 1。

3.3 对运动协调能力的影响 (转棒法)

与溶媒对照组比较，紫苏油对照组小鼠在转棒上的平均停留时间基本相当，而辅酶 Q10 低、中、高剂量组的平均停留时间有所增加，但差异不显著。与紫苏油对照组比较，辅酶 Q10 低、中、高剂量组的平均停留时间亦有所增加，差异不显著。见表 2。



与溶媒对照组比较: ** $P < 0.01$; 与紫苏油对照组比较: ## $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs vehicle control group; ## $P < 0.01$ vs perillartine group

图1 自发动跨区次数的统计结果 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Fig. 1 Times of crossing district in spontaneous activity experiment ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

表2 辅酶 Q10 对运动协调能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Table 2 Effect of coenzyme Q10 on motor coordination capability ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	平均停留时间/s
溶媒对照	—	32.7±24.64
紫苏油对照	—	34.3±22.88
辅酶Q10	1.5	50.6±51.61
	3.0	61.8±56.66
	6.0	60.4±56.48

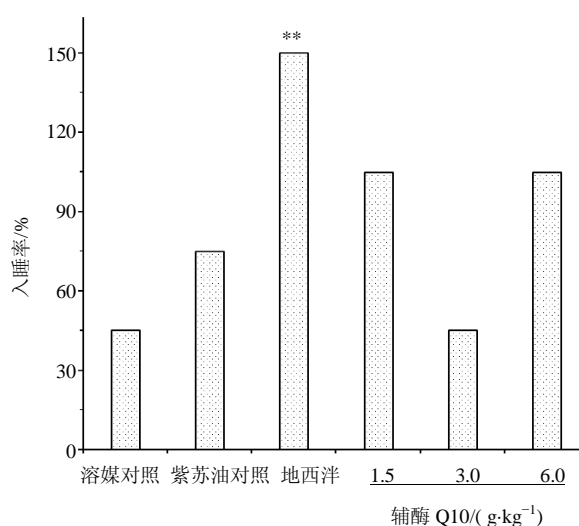
3.4 与阈下剂量戊巴比妥钠协同作用的观察

与溶媒对照组比较, 地西洋组小鼠入睡率明显增加, 且差异显著 ($P < 0.01$); 辅酶 Q10 中剂量组无明显变化, 紫苏油对照组和辅酶 Q10 低、高剂量组有所增加, 但差异不显著。

与紫苏油对照组比较, 除辅酶 Q10 中剂量组入睡率略有降低, 地西洋对照组、辅酶 Q10 低、高剂量组小鼠均略有增加, 差异不显著。见图 2。

4 讨论

安全药理学 (safety pharmacology) 是新药临床前安全性评价领域中一个重要的组成部分, 主要是考察受试药物在短时间内是否威胁到人体重要器官的功能, 如: 心血管系统、呼吸系统和中枢神经系统, 或临床适应证涉及上述系统之外的其他器官时, 对这些器官也需要进行考察^[8]。考察一般采用科学



与溶媒对照组比较: ** $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs vehicle control group

图2 与阈下剂量戊巴比妥钠协同作用的统计结果 ($n = 12$)
Fig. 2 Results of synergistic reaction of coenzyme Q10 with sub-threshold dose of pentobarbital sodium ($n = 12$)

有效的、国际公认的体内和体外实验方法, 同时鼓励使用新技术和新方法, 评价和预测新药在人体临床试验中可能出现的不良反应。

目前, 在中外学者的不断努力下, 安全药理学评价技术方法有了进一步的发展, 取得了一定的成就, 主要有①利用生物信号遥测系统对心血管系统、呼吸系统进行研究, Dewhurst 等^[9]利用生物信号遥测系统准确监测大鼠的各种心电、血压参数; ②安全药理学生物标志物的探索研究, Bahri 等人^[10]研究发现瓜氨酸是体内参与中间代谢的氨基酸之一, 瓜氨酸可作为分析小肠吸收功能的生物标志物, 从瓜氨酸的浓度变化可以分析出小肠上皮细胞吸收功能的质量状况; ③心肌干细胞为基础的毒理学研究, Davila 等^[11]利用心肌细胞起源于胚胎干细胞的特点, 通过胚胎干细胞建立心肌细胞安全药理的试验模型, 研究外源性化学物质对胚胎干细胞分化的影响, 从而判断药物潜在的心脏毒性; ④用新型动物模型对中枢神经系统进行研究, Easter 等^[12]采用药物诱导海马产生惊厥的方法, 建立中枢神经系统模型, 通过对海马下丘脑组织病理切片研究, 评价药物对中枢神经系统的影响; Mueller 等^[13]研究药物神经毒性时, 斑马鱼胚胎加药处理后, 利用微分干涉相差显微镜或特殊染色方法可以直接在体内观察特定神经元和神经突的改变。这些研究为将来的安

全药理学评价技术的发展奠定了一定的基础,同时药物安全药理学研究技术还处于不断完善和提高中,在今后的研究中必须加大科研力度,进一步克服当前安全药理学研究中存在的一些技术上的问题,加强药物在临床使用方面的安全性。

由于辅酶 Q10 对机体有着重要的生理功能,其在医药领域、食品添加剂、化妆品等方面有着广泛应用。文献报道^[14-15],对于辅酶 Q10 单次给药的急性毒性(大于 30.0 g/kg)、遗传毒性和多次(30 d ig 给药)给药毒性(0.36、0.54 和 0.72 g/kg)进行了深入的研究,结果表明辅酶 Q10 在此 3 个方面的毒性观察均未发现动物毒性反应,但对动物大剂量给予辅酶 Q10 的中枢神经系统毒性方面的研究到目前为止还未见报道。

在本研究中,采用小鼠一般行为、自发活动、协调运动和与阈下剂量戊巴比妥钠的协同作用的 4 个试验^[6],对辅酶 Q10 中枢神经系统毒性进行研究,观察 1.5、3.0 和 6.0 g/kg (相当于临床等效剂量的 75、150 和 300 倍) 3 个剂量辅酶 Q10 单次 ig 给药后,对小鼠的中枢神经系统是否具潜在毒性。结果显示,在一般行为活动观察试验中,未见与神经系统毒性相关的表现;各剂量组小鼠在自发活动跨区次数、转速为 30 r/min 的匀速转棒上的停留时间、以及 ip 阈下剂量(28 mg/kg)戊巴比妥钠的入睡率与溶媒对照和紫苏油对照组比较均无显著性差异,表明未引起中枢神经系统相关毒性反应。

以上安全性研究结果表明,在本实验条件下,大剂量服用辅酶 Q10 对小鼠中枢神经系统未表现出明显的毒性作用,该结果可为后续开展辅酶 Q10 大剂量用药研究及临床应用提供可靠的实验依据。

参与文献

- [1] 张继忠,迟莉丽,沈亚领. 辅酶 Q10 的生产及在医学领域中的应用 [J]. 上海应用技术学院学报: 自然科学版, 2004, 4(4): 301-305.
- [2] 李家洲. 辅酶 Q10 的功能与应用研究进展 [J]. 食品与药品, 2013, 15(6): 433-435.
- [3] 王文慧,王沥浩,郭咏昕,等. 辅酶 Q10 应用的研究进展 [J]. 黑龙江农业科学, 2014(3): 147-149.
- [4] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [5] 孙晓芳,韩艳梅,杜锦朵,等. 辅酶 Q10 抗衰老小鼠的脂质过氧化作用 [J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 4(17): 3112-3113.
- [6] 药物安全药理研究技术指导原则 [S]. 国家食品药品监督管理局, 2014: 54.
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [8] 李波. 安全药理学的国内外发展概况 [J]. 中国新药杂志, 2004, 13(1): 964-968.
- [9] Dewhurst M, Adeyemi O, Harris J, et al. Application of modified ECG lead placement technique in rat telemetry safety studies: outcome and potential use [J]. J Pharmacol Toxicol Meth, 2008, 58(2):158.
- [10] Bahri S, Curis E, El Wafi F Z, et al. Mechanisms and kinetics of citrulline uptake in a model of human intestinal epithelial cell [J]. Clin Nutr, 2008, 27(6): 872-880.
- [11] Davila J C, Cezar G G, Thiede M, et al. Use and application of stem cells in toxicology [J]. Toxicol Sci, 2004, 79(2): 214-223.
- [12] Easter A, Sharp T H, Valentin J P, et al. Pharmacological validation of a semi-automated in vitro hippocampal brain slice assay for assessment of seizure liability [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2007, 56(2): 223-233.
- [13] Mueller T, Wullimann M F. Anatomy of neurogenesis in the early zebrafish brain [J]. Brain Res Dev Brain Res, 2003, 140(1): 137-155.
- [14] 梁慧莉,赵鹏,李凤文,等. 辅酶 Q10 毒理学安全性评价 [J]. 中国热带医学, 2009, 9(2): 237-240.
- [15] 吴克勤,黄建平,钟礼云,等. 辅酶 Q10 毒性研究 [J]. 海峡药学, 2012, 24(8): 39-41.