

# 辅酶 Q10 预处理对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及机制研究

韩光<sup>1,2</sup>, 李晓东<sup>1,3</sup>, 唐健杰<sup>1,4</sup>, 戴永逸<sup>1</sup>, 王迪<sup>1\*</sup> (1.辽宁医学院基础医学院细胞生物学教研室, 辽宁 锦州 121000; 2.辽宁省盘锦市中心医院, 辽宁 盘锦 124000; 3.中国人民解放军第205医院重症医学科, 辽宁 锦州 121000; 4.锦州市第二医院, 辽宁 锦州 121000)

**摘要:** 目的 探讨辅酶 Q10 预处理对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及可能的相关机制。方法 90 只成年 SD 大鼠,  $\delta$ , 随机分成假手术组(sham)、缺血再灌注组(I/R)、依达拉奉组(Y)、辅酶 Q10 预处理低剂量组(LQ)和高剂量组(HQ)。采用线栓法阻断大脑中动脉制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型, 24 h 后进行神经行为学评分, 测定脑水含量; 检测血清和脑组织中 SOD 活性及 MDA 含量; 免疫组化检测 Bcl-2、Bax 和 TNF- $\alpha$  表达情况。结果 与 I/R 组相比, HQ 组神经行为学评分明显降低, 脑水含量显著减少, 血清和脑组织中 SOD 活性升高, MDA 含量降低。Bcl-2 阳性表达率明显上升, Bax 和 TNF- $\alpha$  阳性表达率明显下降。结论 辅酶 Q10 可能通过有效的减少自由基损伤, 降低细胞凋亡和炎症因子水平对脑缺血再灌注损伤大鼠起到保护作用。

**关键词:** 辅酶 Q10; 超氧化物歧化酶; Bcl-2; Bax; 肿瘤坏死因子

中图分类号: R979.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)07-0715-04

## Protective Effects and Related Mechanisms of Pre-treated Coenzyme Q10 on Rats Suffered from Focal Cerebral Ischemic-reperfusion Injury

HAN Guang<sup>1,2</sup>, LI Xiaodong<sup>1,3</sup>, TANG Jianjie<sup>1,4</sup>, DAI Yongyi<sup>1</sup>, WANG Di<sup>1\*</sup> (1.Department of Cellbiology, Basic Medical College of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China; 2.Panjin Central Hospital, Panjin 124000, China; 3.The 205th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Jinzhou 121000, China; 4.Jinzhou Second Hospital, Jinzhou 121000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the protective effect of coenzyme Q10 on focal cerebral ischemic-reperfusion injured rats. **METHODS** Ninety adult male Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into 5 groups: sham-operated group (sham), ischemic-reperfusion group (I/R), Edaravone group (Y), coenzyme Q10 pre-treated low dose and high dose group (LQ and HQ). Models were established with middle cerebral artery occlusion. After 24 hours, neuroethology score and brain water content were detected. Activities of superoxide dismutase (SOD) and contents of malondialdehyde (MDA) were measured in blood serum and brain tissue from the experimental rats. The expression of Bcl-2, Bax and TNF- $\alpha$  protein were detected by immunohistochemistry staining. **RESULTS** Neuroethology score and brain water content significantly decreased in HQ group comparing with I/R group. Activities of SOD were higher and contents of MDA were lower in HQ group than I/R group in both blood serum and brain tissue. Immunohistochemistry staining showed that the positive cell number of expressing Bcl-2 significantly increased and the positive cell number of expressing Bax and TNF- $\alpha$  significantly decreased in HQ group compared with I/R group. **CONCLUSION** Coenzyme Q10 may protect rats from ischemic-reperfusion injury through scavenging free radicals and improving the anti-oxidative ability of the brain tissue and decreasing cell apoptosis and the level of inflammatory factors.

**KEY WORDS:** coenzyme Q10; SOD; Bcl-2; Bax; TNF- $\alpha$

缺血性脑血管病是现代社会致死、致残的最主要的疾病之一, 给家庭和社会带来严重的负担。及时地恢复脑血流供应有利于减轻神经细胞的功能损伤, 然而在某些情况下缺血后再灌注会进一步导致脑组织损伤和功能障碍<sup>[1]</sup>, 所以抑制再灌注损伤已成为缺血性脑血管病治疗的重要环节。

辅酶 Q10 是重要的抗氧化剂和免疫增强剂, 它是线粒体电子传递链的重要组成部分, 起到能

量转换剂和明显的抗脂质过氧化作用<sup>[2]</sup>。在临床上, 它具有抗衰老、抗疲劳、抗高血压和保护心脏等作用, 目前广泛应用于心血管疾病的辅助治疗中<sup>[3]</sup>, 但对于脑损伤的保护作用研究甚少。本研究通过建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型, 评估神经行为学得分, 检测脑组织水含量、SOD 活力和 MDA 含量以及 Bcl-2、Bax 和 TNF- $\alpha$  蛋白表达情况来探讨辅酶 Q10 对脑缺血再灌注损伤大鼠的

基金项目: 锦州市科学技术计划项目(11A1E32); 国家人力资源社会保障部留学人员科技活动项目(2011LX007)

作者简介: 韩光, 女, 主治医师 Tel: 15842735168 E-mail: tianzhidong0068@163.com \*通信作者: 王迪, 女, 博士, 教授 Tel: (0416)4673351 E-mail: tulip\_wang@yahoo.com

保护作用及相关机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物

成年 SD 大鼠 90 只, ♂, 体质量 220~250 g, 由辽宁医学院实验动物中心提供。实验动物合格证号: SCXK(辽)2008-002。

### 1.2 药品及试剂

辅酶 Q10 购自卫材(中国)药业有限公司, 批号: 110914A; SOD、MDA 生化检测试剂盒购于南京建成科技有限公司, 批号: 20100523。

### 1.3 分组及给药

大鼠随机分为 5 组: 假手术组(sham)、缺血再灌注组(I/R)、依达拉奉组(Y)、辅酶 Q10 预处理低剂量组(LQ)和高剂量组(HQ), 每组 18 只。LQ 和 HQ 组于术前灌胃给药 4 周, 剂量分别为  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  和  $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。Y 组于缺血前 0.5 h 和再灌注后 2 h 尾静脉注射给药, 剂量为  $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{次}^{-1}$ 。

### 1.4 模型建立

按 Longa<sup>[4]</sup> 和 Nagasawa<sup>[5]</sup> 报道的方法加以改进制备大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血再灌注模型。 $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  水合氯醛  $350 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  腹腔注射麻醉大鼠, 颈部正中切口, 分离并结扎左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉和颈内动脉的颅外分支-翼腭动脉。将颈内动脉远心端用动脉夹夹闭, 距颈总动脉分叉处近心端 0.5 cm 处将颈总动脉剪一小口, 插入鱼线, 松开动脉夹, 向颈内动脉插入鱼线( $20\pm 2$ )mm, 直至稍感阻力, 栓线进入颈内动脉后, 穿过颈总动脉起始端至大脑前动脉近端, 阻断颈总动脉的所有血流。1 h 后, 缓慢拔出鱼线, 再灌注 24 h。假手术组仅将栓线插入颈总动脉及颈内动脉但不阻断大脑中动脉, 其余步骤相同。术前禁食 12 h, 术中及术后维持体温在  $37^\circ\text{C}$  左右, 术后单笼饲养。

### 1.5 检测指标

**1.5.1 评分标准** 24 h 后进行神经行为学评分, 0 分: 无神经损伤症状; 1 分: 不能完全伸直对侧前爪; 2 分: 向右侧转圈; 3 分: 向右侧倾倒; 4 分: 不能直立行走, 丧失意识。有效模型为 1~3 分。

**1.5.2 脑水含量的测定** 每组随机取 6 只大鼠于再灌注 24 h 后处死动物, 断头取脑。采用干湿重法进行测定, 取缺血侧大脑半球脑组织标本, 用电子天平称取湿重, 然后将标本置于  $110^\circ\text{C}$  红外

线干燥箱内烘干 48 h 至恒重, 称取干重。脑水含量用百分比表示, 即脑水含量(%)=(湿重-干重)/湿重 $\times 100\%$ 。

**1.5.3 检测 SOD 活性和 MDA 含量** 每组随机取 6 只大鼠, 开胸自心尖处取血 2 mL,  $3500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min, 分离血清, 置  $-80^\circ\text{C}$  备用。然后断头取脑, 于冰浴中制备 10% 脑组织匀浆,  $4^\circ\text{C}$   $3500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取上清, 置  $-80^\circ\text{C}$  备用。根据 SOD 和 MDA 试剂盒说明书检测血清和脑组织检测 SOD 活性和 MDA 含量。

**1.5.4 免疫组化染色** 石蜡切片于二甲苯中脱蜡, 梯度乙醇中进行复水, 高压修复抗原 2 min, PBS 洗涤  $4 \text{ min}\times 3$  次, 切片放入  $3\% \text{ H}_2\text{O}_2$  中室温孵育 15 min, 然后加入封闭剂室温作用 1 h, 滴加一抗,  $4^\circ\text{C}$  过夜。加入二抗,  $37^\circ\text{C}$  孵育 30 min, DAB 显色, 苏木素复染, 中性树胶封片, 镜下观察。

**1.5.5 统计学方法** 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 所有数据用  $\bar{x}\pm s$  表示, 采用单因素方差分析,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠神经行为学评分

与 sham 组相比, 其余 4 组大鼠的神经行为学评分都明显升高; 与 I/R 组相比, Y 组和 HQ 组的神经行为学评分明显降低; 差异均具有统计学意义。LQ 组与 I/R 组之间神经行为学评分无差异。结果见表 1。

### 2.2 各组大鼠脑水含量

与 sham 组相比, 其余 3 组大鼠脑水含量明显升高; 与 I/R 组相比, Y 组和 HQ 组的脑水含量明显降低, 差异均具有统计学意义。LQ 组与 I/R 组之间脑水含量无差异。结果见表 1。

表 1 各组大鼠神经行为学评分和脑水含量( $n=6$ )

Tab 1 Results of neuroethology score and brain water content( $n=6$ )

分组	神经行为学评分	脑水含量/%
sham	0.00 $\pm$ 0.00	70.89 $\pm$ 0.19
I/R	2.50 $\pm$ 0.55 <sup>1)</sup>	80.77 $\pm$ 0.77 <sup>1)</sup>
Y	1.67 $\pm$ 0.52 <sup>1)3)</sup>	76.09 $\pm$ 0.45 <sup>1)3)</sup>
LQ	2.17 $\pm$ 0.41 <sup>1)</sup>	79.65 $\pm$ 0.29 <sup>1)</sup>
HQ	1.83 $\pm$ 0.41 <sup>1)2)</sup>	77.24 $\pm$ 0.64 <sup>1)2)</sup>

注: 与 sham 组相比, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与 I/R 组相比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$   
Note: Compared with sham group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with I/R group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$

### 2.3 血清和脑组织中 SOD 活力和 MDA 含量

与 sham 组相比, I/R 组 SOD 活力显著降低,

MDA 含量显著升高; 与 I/R 组相比, Y 组和 HQ 组 SOD 活力显著升高, MDA 含量显著降低, 差异均具有统计学意义。结果见表 2 和表 3。

表 2 血清中 SOD 活力和 MDA 含量(n=6)

Tab 2 Activities of SOD and contents of MDA were measured in blood serum(n=6)

分组	总 SOD 活力/U·mL <sup>-1</sup>	MDA 含量/nmol·mL <sup>-1</sup>
sham	202.41±13.14	2.65±0.17
I/R	159.06±12.33 <sup>1)</sup>	4.44±0.47 <sup>1)</sup>
Y	146.26±8.00 <sup>2)</sup>	3.26±0.58 <sup>3)</sup>
LQ	171.88±19.23	3.57±0.43 <sup>2)</sup>
HQ	180.57±12.61 <sup>2)</sup>	3.39±0.13 <sup>3)</sup>

注: 与 sham 组相比, <sup>1)</sup>P<0.01; 与 I/R 组相比, <sup>2)</sup>P<0.05, <sup>3)</sup>P<0.01  
Note: Compared with sham group, <sup>1)</sup>P<0.01; compared with I/R group, <sup>2)</sup>P<0.05, <sup>3)</sup>P<0.01

表 3 脑组织中 SOD 活性和 MDA 含量(n=6)

Tab 3 Activities of SOD and contents of MDA were measured in brain tissue(n=6)

分组	总 SOD 活力/U·mg <sup>-1</sup> prot	MDA 含量/nmol·mg <sup>-1</sup> prot
sham	148.12±2.71	3.05±0.11
I/R	126.26±1.82 <sup>1)</sup>	4.34±0.42 <sup>1)</sup>
Y	190.20±21.50 <sup>3)</sup>	2.97±0.55 <sup>2)</sup>
LQ	138.22±9.52 <sup>2)</sup>	4.05±0.31
HQ	140.01±6.93 <sup>3)</sup>	3.33±0.24 <sup>3)</sup>

注: 与 sham 组相比, <sup>1)</sup>P<0.01; 与 I/R 组相比, <sup>2)</sup>P<0.05, <sup>3)</sup>P<0.01  
Note: Compared with sham group, <sup>1)</sup>P<0.01; compared with I/R group, <sup>2)</sup>P<0.05, <sup>3)</sup>P<0.01

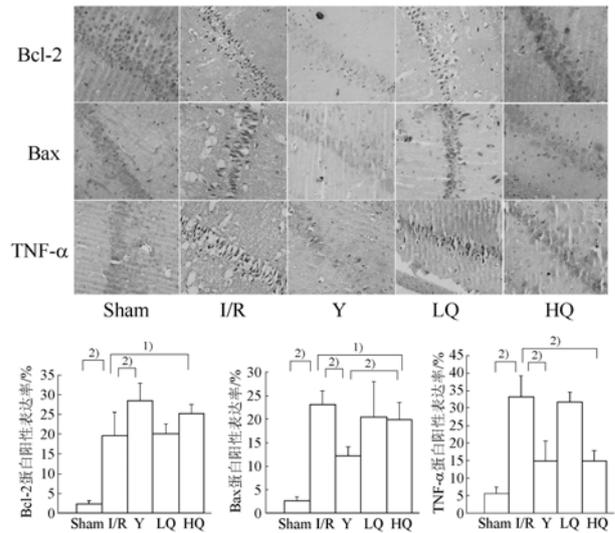
## 2.4 免疫组化染色

与 sham 组相比, I/R 组海马 CA1 区 Bcl-2、Bax 和 TNF-α 蛋白表达阳性细胞均显著增加(×400); 与 I/R 组相比, Y 组和 HQ 组海马 CA1 区 Bcl-2 蛋白阳性表达率显著升高, Bax 和 TNF-α 蛋白阳性表达率显著下降, 差异均具有统计学意义, 但 LQ 组与 I/R 组之间无统计学意义。结果见图 1。

## 3 讨论

脑缺血再灌注损伤的机制比较复杂, 研究表明主要与自由基增多和脂质过氧化、线粒体功能障碍和炎症反应等多种因素相关<sup>[1]</sup>。

SOD 是生物体内重要的抗氧化酶, 也是生物体内清除氧自由基的首要物质。它可对抗与阻断氧自由基对细胞造成的损害, 并及时修复受损细胞。MDA 是脂质过氧化反应的最终产物, 它会引引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合, 具有细胞毒性<sup>[6-7]</sup>。SOD 活性的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力, 而 MDA 含量的高低间接反映



<sup>1)</sup>P<0.05, <sup>2)</sup>P<0.01

图 1 免疫组化染色检测大鼠海马 CA1 区 Bcl-2、Bax 和 TNF-α 蛋白表达(400×)

Fig 1 Expression of Bcl-2, Bax and TNF-α protein were detected by Immunohistochemistry staining(400×)

了机体受自由基攻击的严重程度。Bcl-2 是最主要的凋亡抑制基因, 它与 Bax 结合形成异源二聚体, 封闭 Bax 活性, 抑制下游凋亡级联反应。Bax 是最主要的凋亡促进基因, 它可使细胞色素 C 穿过线粒体内膜, 激活 caspase 的级联反应, 导致细胞凋亡<sup>[8]</sup>。Bcl-2 和 Bax 表达的比例决定着细胞在受到凋亡信号刺激时是生存还是死亡。TNF-α 是炎症反应的起始因子之一, 具有多效性, 能通过促凝血、增加血脑屏障通透性、诱导黏附分子或其他炎症介质表达, 加重脑缺血再灌注损伤<sup>[9]</sup>。

本实验结果显示与 sham 组相比, I/R 组脑组织脑水含量明显增加, 呈水肿状态; 血清和脑组织中 SOD 活性显著下降、MDA 含量显著升高, Bcl-2、Bax 和 TNF-α 阳性细胞表达率显著上升; 而采用依达拉奉和高剂量辅酶 Q10 预处理可明显降低脑水含量、提高 SOD 活性, 降低 MDA 含量, Bcl-2 阳性表达率较 I/R 组进一步增加, 但 Bax 和 TNF-α 阳性细胞表达率明显减少。HQ 组与依达拉奉处理组之间无统计学差异。同时本研究发现 TNF-α 蛋白的变化较 Bcl-2 和 Bax 强烈, 推测可能是由于在脑缺血再灌注损伤中最早的反应是局部白细胞积聚及炎性细胞因子的出现和增多, 而白细胞的激活, 可释放大量促炎的细胞因子。而 TNF-α 属于早期炎症因子, 所以表达相对强烈。

以上结果表明辅酶 Q10 预处理对脑缺血再灌

注损伤具有保护作用且呈现一定的剂量依赖性，高剂量辅酶 Q10 可提高脑组织抗氧化酶活性，增加对自由基的清除能力，减轻自由基连锁反应引起的脑损伤，减少细胞凋亡和降低炎症因子的表达水平，对防治缺血性脑损伤可能具有良好的应用前景，其更多相关机制有待进一步研究。

## REFERENCES

- [1] XIANG J. Progress on treating cerebrovascular ischemia reperfusion injury [J]. *Guangdong Med J*(广东医学), 2006, 27(12): 1922-1924.
- [2] YOUNG A J, JOHNSON S, STEFFENS D C, et al. Coenzyme Q10: A review of its promise as a neuroprotectant [J]. *CNS Spectr*, 2007, 12(1): 62-68.
- [3] LI W J. Clinical application and physiology of coenzyme Q10 [J]. *Lett Biotechnology*(生物技术通讯), 2007, 18(5): 882-884.
- [4] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al.

- Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [5] NAGASAWA H, KOGURE K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion [J]. *Stroke*, 1989, 20(8): 1037-1043.
- [6] LU X Y. Effect of Baweichenxiang powder on acute hypoxic cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Int J Trad Chin Med*(国际中医中药杂志), 2011, 33(11): 995-997.
- [7] MAO X J, ZHANG Q F, LIANG J F, et al. Effects of lycopene on free radicals metabolism in Focal Ischemia Reperfusion rats [J]. *J Med Res*(医学研究杂志), 2011, 40(9): 95-97.
- [8] LI J L, MU K, ZHAO D M. Effects of ginkgo biloba extract Oil the expression of Bcl-2, Bax proteins and activities of caspase3 following ischemic reperfusion injury in rats [J]. *J Binzhou Med Coll*(滨州医学院学报), 2011, 34(3): 187-191.
- [9] LI L, XU D M, WANG W, et al. Advance in damage mechanism on blood brain barrier after cerebral ischemia-reperfusion and neuroprotective drugs [J]. *Chin J Rehabil Theory Pract*(中国康复理论与实践), 2009, 5(10): 901-904.

收稿日期: 2013-01-03

## 新型低氧还原剂 Q39 通过阻断 HIF-1 $\alpha$ 转运引起肝癌 Bel-7402 细胞凋亡

邵燕飞<sup>1,2</sup>, 俞佳<sup>2</sup>, 朱虹<sup>1</sup> (1. 浙江大学药学院药理毒理与生化药学研究所, 杭州 310058; 2. 浙江省人民医院药剂科临床药理学室, 杭州 310014)

**摘要:** 目的 评价 Q39 低氧条件下诱导肝癌细胞 Bel-7402 细胞凋亡的抗肿瘤活性及其机制。方法 MTT 法测定 Q39 对人肝癌细胞 Bel-7402 增殖抑制作用。PI 染色法检测 Q39 诱导人肝癌细胞凋亡作用。免疫荧光法检测 HIF-1 $\alpha$  蛋白的转运和表达。结果 Q39 在常氧和低氧下均抑制肝癌 Bel-7402 细胞的生长。Q39 在低氧条件下促进 Bel-7402 肿瘤细胞凋亡。Q39 通过抑制 ERK1/2 的磷酸化, 明显抑制 HIF-1 $\alpha$  的转运。结论 Q39 在低氧条件下通过抑制 ERK1/2 信号通路引起 Bel-7402 肿瘤细胞凋亡。

**关键词:** Q39; 低氧诱导因子 HIF-1 $\alpha$ ; ERK1/2; 细胞凋亡; 抗肿瘤活性

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)07-0718-05

## Novel Hypoxia-selective Compound Q39 Induced Bel-7402 Cell Apoptosis via Blocking HIF-1 $\alpha$ Translocation

SHAO Yanfei<sup>1,2</sup>, YU Jia<sup>2</sup>, ZHU Hong<sup>1</sup> (1. Institute of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Department of Clinical Pharmacy, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the anti-cancer activity and mechanism of Q39 in hypoxia. **METHODS** The anti-proliferation activity of Q39 were analyzed by MTT, apoptosis was detected by PI and flowcytometry analysis. HIF-1 $\alpha$  protein expression level and translocation was analyzed by immunostaining and WB. **RESULTS** The present study indicated that Q39 exerted anti-proliferative effects against human cancer cells Bel-7402 in hypoxia. Downregulation of ERK1/2 inhibited by Q39 resulted in blocking HIF-1 $\alpha$  translocation, which further induced the apoptosis of Bel-7402. **CONCLUSION** These findings build the rationale for further development of candidate compound Q39 against hepatoma(Bel-7402).

**KEY WORDS:** Q39; HIF-1 $\alpha$ ; ERK1/2; apoptosis; anti-tumor activity

作者简介: 邵燕飞, 女, 药师 Tel: (0571)85893234 E-mail: shaoyanfei3@sina.com  
(0571)88208401 E-mail: hongzhu@zju.edu.cn

\*通信作者: 朱虹, 女, 博士, 硕导, 副教授 Tel: