

吗丙嗪对阿霉素诱导的大鼠心肌半醌自由基的清除作用¹

张予、张章沐 (河南省医学科学研究所药理室, 郑州 450052, 中国)

赵保路、韩家康²、陈惟昌²、忻文娟 (中国科学院生物物理研究所, 北京 100080, 中国)

Scavenging of probimane on semiquinone free radical formation by doxorubicin in rat heart

ZHANG Yu, ZHANG Tan-Mu (*He-nan Institute of Medical Sciences, Zhengzhou 450052, China*)

ZHAO Bao-Lu, HAN Jia-Kang², CHEN Wei-Chang², XIN Wen-Juan (*Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*)

ABSTRACT Probimane, *dl*-bis (4-morpholin-methyl 3,5-dioxopiperazine-1-yl) propane first synthesized in China, is a dioxopiperazine compound with antineoplastic, antimetastatic and radiopotentiating activities. In order to evaluate the mechanisms of cardiotoxicity protective action of probimane, the free radical induced by doxorubicin were analysed by electron spin resonance (ESR) techniques. Our studies showed that doxorubicin stimulated the formation of semiquinone free radicals in the rat heart homogenate and heart cell mitochondria systems, and probimane inhibited the free radical formation in both systems, with the dose-dependent and time-dependent responses. The inhibitory rates of doxorubicin free radical formation in rat heart homogenate system by probimane 0.6 mmol · L⁻¹ at time of 3, 5, 10, 15, 30, 45 and 60 min were 44.6%, 43.0%, 51.5%, 74.3%, 68.1%, 56.1% and 39.5% respectively. The inhibitory rates of semiquinone free radical formation in mitochondria system by probimane at the concentration of 0.02, 0.06, 0.6, 1.2 and 2.4 mmol · L⁻¹ were 17.07%, 29.87%, 63.95%, 64.62% and 83.64%, respectively. Probimane had no effect on NADH₂, but inhibited NADH dehydrogenase activity at higher concentration.

KEY WORDS probimane; doxorubicin; antineoplastic agents; electron spin resonance; free radicals; heart mitochondria

Received 1989 May 15 Accepted 1990 Sep 11

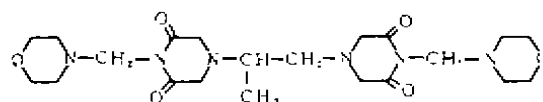
¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China No 3880884

² Chinese-Japanese Friendship Hospital, Beijing 100013, China

摘要 本文用 ESR 技术及 uv 分光光度法分别研究了吗丙嗪对阿霉素和大鼠心肌匀浆及心肌线粒体相互作用产生的半醌自由基的清除作用及吗丙嗪对还原型辅酶 I, 还原型辅酶 I 脱氢酶的影响。吗丙嗪可明显清除阿霉素与心肌作用后所产生的半醌自由基, 其清除率呈时间依赖及剂量依赖关系, 同时吗丙嗪在大剂量时可以通过还原型辅酶 I 增加 NADH₂ 含量。

关键词 吗丙嗪; 阿霉素; 抗肿瘤药; 电子自旋共振; 自由基; 心脏线粒体

吗丙嗪 (probimane, AT-2153) 是 80 年代初由中国科学院上海药物所合成的新药, 对多种实验肿瘤有抑制作用, 可抑制小鼠体液免疫反应⁽¹⁾。本实验室发现吗丙嗪不仅能增强阿霉素的抗肿瘤作用, 而且还可对抗其心脏毒性。用电子自旋共振 (electron spin resonance, ESR) 自旋捕集技术研究发现: 吗丙嗪可清除 Fenton 反应产生的 ·OH, 也能清除由 TPA 刺激人多形核白细胞呼吸暴发时产生的活性氧自由基⁽²⁾, 由于阿霉素的毒性^(3,4)与自由基有关^(5,6), 本实验用 ESR 观察吗丙嗪对心肌匀浆及心肌线粒体中所产生的半醌自由基的清除作用。



Probimane (AT-2153)

MATERIALS AND METHODS

吗丙嗪, 白色粉末, 由中国科学院上海药物研究所提供, 用前溶于水; 阿霉素, 红色粉末, 由意大利 Farmitalin 公司提供, 用前溶于生理盐水; 还原型辅酶 I 二钠盐 (β -nicotinamide

adenine diducledite) CP 试剂, 白色粉末, 避光, 4℃ 保存, 用前用 Tris-KCl (pH 7.4) 缓冲液配制; *N*-2-羟乙基哌嗪-*N'*-2-乙磺酸(*N*-2-hydroxyethyl piperazine-*N'*-ethanesulfonic acid, HEPES)中国科学院生物化学所产品, 其它均为国产 AR 试剂。

心肌匀浆的制备及波谱测定 Wistar 大鼠 7 只, 体重 $258 \pm \text{SD } 21 \text{ g}$, δ , ip 戊巴比妥钠 $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 麻醉后立即取心, 4℃ 盐水冲洗, 滤纸吸干水分, 除去结缔组织, 称取心肌组织 0.8 g , 用 1:4 (wt/vol) 4℃ 的 HEPES-KCl 缓冲液 (HEPES $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, KCl $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4) 为介质, $2400 \times g$ 制成匀浆, 全部操作在冰浴中进行。实验分 7 组, 每组均设对照组(用等容量的 HEPES-KCl 缓冲液)及用药组, 每组 4 个平行管。用药组分别取吗丙嗪 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与心肌匀浆孵育 3, 5, 10, 15, 30, 45 和 60 min 再加入阿霉素 $1280 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用后立即加入还原型辅酶 I $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 混匀, 吸入石英毛细管中, 放入 ESR 谐振腔内测试。

线粒体的分离与波谱测定 取 $264 \pm 24 \text{ g}$ 的 Wistar 大鼠, δ , 麻醉后立即取心, 4℃ 盐水冲洗, 用剪刀剪碎, 碎块悬于 5 倍的预冷分离液中 (蔗糖 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, EDTA- Na_2 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Tris-HCl $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.2) 制成匀浆, 将匀浆移入离心管中 2 倍稀释, 然后置于西德产 24K 型高速离心机中, $300 \times g$ 离心 10 min, 取上清在 $5000 \times g$ 离心 10 min 取沉淀加分离液再悬浮, 在 $5000 \times g$ 再次离心 10 min⁽⁷⁾。取沉淀(线粒体沉积物)加入适量分离液混匀后-4℃ 保存备用。线粒体蛋白浓度用 Folin-酚试剂法测定⁽⁸⁾。

取线粒体 25.4 mg ($1272 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) 加入吗丙嗪作用 5 min 后, 加入阿霉素 $1280 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及还原型辅酶 I $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 混匀后吸入石英毛细管中, 放入 ESR 谐振腔中测试。

用日本电子自旋共振波谱仪(JES-RE1X)

测试波谱。条件为 X 波段, 功率 5 mW, 100 kHz 高频调制, 调制幅度 2.5 G, 扫描速度 25 Gmin^{-1} , 时间常数 0.3 s, 温度 20℃。

还原型辅酶 I (NADH₂) 的 uv 分光光度的测定

1 吗丙嗪与 NADH₂ 作用在 uv 分光光度测定 实验分为对照组(用等容量的 Tris 缓冲液)及用药组(2 ml 不同浓度的吗丙嗪)分别与 1 ml NADH₂ $0.3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (以 Tris 缓冲液 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PH 8.1 临用前配制)在 37℃ 水浴中作用 3 min 后, 立即加入 1.67% 偏磷酸沉淀液(H_3PO_3 16.7 g, EDTA 0.5 g, NaCl 280 g 加蒸馏水至 1000 ml 制成) 0.2 ml 中止反应, 混匀, 在分光光度计上测定 A 值。

2 吗丙嗪在线粒体存在的条件下与 NADH₂ 作用在 uv 分光光度测定 按前述方法制备线粒体, 实验分组同 1, 在与 NADH₂ 作用后, 分别加入线粒体 3.0 mg ($300 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) 37℃ 水浴中作用 10 min 后, 立即加入偏磷酸, 混匀, 用日本岛津 uv-365 型分光光度计测定 A 值, 波长 340 nm, 10 mm 石英比色皿, 蒸馏水调零。标准曲线的绘制采用 uv 分光光度法⁽⁹⁾。

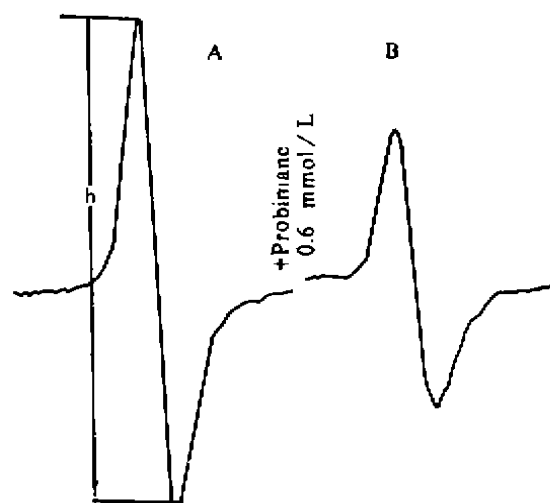


Fig 1. ESR spectra of doxorubicin semiquinone radical obtained with rat heart homogenate. A) without and B) with probimane ($0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

RESULTS

对心肌匀浆的半醌自由基的清除作用 对照组所得的 ESR 波谱如 Fig 1 所示,其 ESR 波谱由单峰构成,其 g 值为 2.006,线宽 2.9 G,与文献中报道的半醌自由基相符;用药组(吗丙嗪 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)与对照组的 ESR 波谱的线型及线宽均相同,仅波幅不同,故用其一次微分线的峰对峰幅度 h 近似代表 ESR 信号的相对强度⁽¹⁰⁾(Fig 1). 药物对阿霉素半醌自由基的清除作用以清除率 E 表示

$$E = h_0 - h_x / h_0 \times 100\% \quad [1]$$

h_0 为对照组 ESR 信号相对强度的平均值, h_x 为用药组样品 ESR 信号相对强度的平均值.

Fig 2 为吗丙嗪 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同作用时间对半醌自由基的清除率. 15 min 前其清除率随时间延长而增强;15 min 后其清除率逐渐下降. 实验结果表明;吗丙嗪可明显清除阿霉素与心肌匀浆作用后所产生的半醌自由基,其累积清除率呈时间依赖关系.

对心肌线粒体的半醌自由基的清除作用 阿霉素与心肌线粒体作用后加入还原型辅酶 I 所测得的 ESR 信号与 Fig 1 类似,它由单峰构成, g 值,线宽与上述心肌匀浆所得的信号相同. 吗丙嗪作用 5 min 后再加入阿霉素及还原

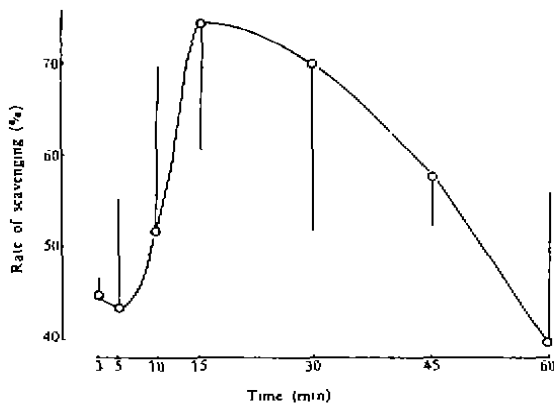


Fig 2. Scavenging effect of probimane ($0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) on doxorubicin semiquinone radicals in rat heart homogenate. $n=3$, $\bar{x} \pm \text{SD}$

型辅酶 I 所得的 ESR 信号也是由单峰构成, g 值,线宽与对照组相同,故其 ESR 相对强度用峰对峰高度表示,吗丙嗪对半醌自由基的清除作用按[1]式计算.

实验结果表明吗丙嗪可明显清除阿霉素与心肌线粒体作用后所产生的半醌自由基,其清除率呈剂量依赖关系.

Tab 1. Scavenging effect of probimane on adriamycin semiquinone radicals. $n=4$, $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs control.

Probimane ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Intensity of ESR signal (mm)	Scavenging rate (%)
0	25.7 ± 3.6	
0.02	$21.3 \pm 2.6^*$	17.1
0.06	$18.0 \pm 5.0^*$	29.8
0.6	$9.3 \pm 5.2^{**}$	64.0
1.2	$9.1 \pm 4.2^{***}$	64.6
2.4	$4.2 \pm 1.0^{***}$	83.6

对 NADH_2 含量的影响 Tab 2 是不同浓度的吗丙嗪与 NADH_2 作用后对 NADH_2 含量的影响,结果提示吗丙嗪对 NADH_2 含量无影响. 以 NADH_2 加线粒体为对照组在 340 nm 处读取 A 值,样品管则以不同浓度的吗丙嗪代替对照组中的 Tris 液,结果见 Tab 2. NADH_2 含量随吗丙嗪浓度的增大而增加,呈剂量依赖关系.

DISCUSSION

阿霉素的心脏毒性与自由基,即阿霉素半

Tab 2. Effect of probimane on NADH_2 activity, $n=4$, $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, vs control.

Probimane ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NADH_2 activity ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	
	without	with mitochondria
0	114.7 ± 3.0	71.2 ± 3.2
0.02	$116.4 \pm 2.5^*$	$67.0 \pm 5.7^*$
0.06	$116.5 \pm 1.0^*$	$71.5 \pm 0.8^*$
0.6	$116.5 \pm 1.7^*$	$73.1 \pm 1.7^*$
1.2	$118.2 \pm 1.8^*$	$91.9 \pm 8.8^{**}$

醌自由基(adriamycin semiquinone radical, ADR)超氧阴离子自由基(superoxide dismutase, O_2^-)及羟自由基($\cdot OH$)有关。国外用 ESR 方法测定阿霉素半醌自由基的产生大多是以心肌线粒体^(11,12)或是以肝细胞微粒体⁽¹²⁾为材料。而我们在实验中采取心肌直接匀浆的方法,并且在室温下也测试到了阿霉素半醌自由基的存在,这在实验方法上尚属于一种新的尝试。用匀浆的方法可以破坏部分细胞膜,使部分线粒体渗出并使药物较容易进入细胞膜而与线粒体发生反应。匀浆的方法较之线粒体、微粒体的分离简便易行。故此法可以作为研究阿霉素半醌自由基及药物对其影响的一个手段。

阿霉素与心肌匀浆孵育后,只有再加入 $NADH_2$ 才能测试到阿霉素半醌自由基的 ESR 信号,所以我们认为此半醌自由基仍是由心肌线粒体 NADH 脱氢酶催化诱导的,这一推论在阿霉素与心肌线粒体这一模型中得到了证实。

吗丙嗪可以明显清除阿霉素半醌自由基,而大剂量吗丙嗪在线粒体存在的条件下,使 NADH 含量增加,推测吗丙嗪可能通过对线粒体 NADH 脱氢酶(NADH dehydrogenase)的抑制,使 $NADH_2$ 脱氢受阻,则产生的阿霉素半醌自由基减少,进而使产生的 O_2^- 及 $\cdot OH$ 也减少,从而减轻阿霉素的心脏毒性。

吗丙嗪作为一种抗癌药在不干扰阿霉素抗肿瘤作用的情况下,又能拮抗其心脏毒性,为此药的临床应用提供了一些理论依据,但吗丙嗪是否可以清除阿霉素诱导产生的 O_2^- 及 $\cdot OH$, 尚需研究。

ACKNOWLEDGMENTS 中国科学院生物物理研究所 ESR 技术组提供技术帮助。侯京武同志参加部分实验工作。

REFERENCES

- 1 Zhang TM, Wang MY, Wang QD, Ren YF. Antineoplastic action and toxicity of probimane and its effect on immunologic functions in mice. *Acta Pharmacol Sin* 1987; 8 : 369
- 2 Dan N, Li XJ, Zhao BL, Zhang TM, Xin WJ. Scavenging effects of probimane on active oxygen free radicals by electron spin resonance. *Acta Pharmacol Sin* 1989; 10 : 443
- 3 Weiss AJ, Manthel RW. Experience with the use of adriamycin in combination with other anticancer agents using a weekly schedule, with particular reference to lack of cardiac toxicity. *Cancer* 1977; 40 : 2046
- 4 Belli JA, Piro AJ. The interaction between radiation and adriamycin damage in mammalian cells. *Cancer Res* 1977; 37 : 1624
- 5 Rajagopalan S, Politi PM, Sinha BK, Myers CE. Adriamycin-induced free radical formation in the perfused rat heart : implications for cardiotoxicity. *Cancer Res* 1988; 48 : 4766
- 6 Myers CE, McGuire WP, Liss RH, Ifrim I, Grotzinger K, Young RC. Adriamycin : the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science* 1977; 197 : 165
- 7 Szarkowska L, Klingenberg M. On the role of ubiquinone in mitochondria. Spectrophotometric and chemical measurements of its redox reactions. *Biochemische Zeitschrift* 1963; 338 : 674
- 8 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265
- 9 吴持平、陈进、童静波、唐文珍、王宏娣、孙宏训. 紫外分光光度法测定血清乳酸脱氢酶同工酶的方法学研究. *临床检验杂志* 1984; 2 : 21
- 10 裘祖文. 电子自旋共振波谱. 北京: 科学出版社 1980; 16-21
- 11 Davies KJA, Doroshov JH, Hochstein P. Mitochondrial NADH dehydrogenase-catalyzed oxygen radical production by adriamycin and the relative inactivity of 5-iminodaunorubicin. *FEBS Letters* 1983; 153 : 227
- 12 Nohl H, Jordan W. OH^- -generation by adriamycin semiquinone and H_2O_2 ; An explanation for the cardiotoxicity of anthracycline antibiotics. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 114 : 197